

提高银杏悬浮培养细胞内酯合成的研究

王关林¹ 李春斌² 方宏筠¹

(¹ 辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029; ² 大连理工大学化工学院, 大连 116012)

摘要: 对12个不同品种的银杏树幼叶及其诱导的愈伤组织进行银杏内酯含量测定, 发现不同基因型的银杏内酯含量存在较大差异: 圆铃和金坠两个品种含量最高, 分别达0.43%和0.41%; 七星果品种含量最低, 为0.13%; 金坠品种幼叶愈伤组织中银杏内酯含量最高, 为0.0334%; 有3个品种的幼叶愈伤组织未检测到银杏内酯。选取银杏内酯含量高、生长旺盛的愈伤组织在B₅液体培养基中进行了细胞悬浮培养, 研究多种生长因子对细胞生长和银杏内酯合成的影响。结果表明, 在150 mL培养瓶中装50 mL培养液, 接种量为30~40 g/L, 培养液初始pH为5.8, 3 000~4 000 lx的强光照, 以30 g/L蔗糖和15 g/L葡萄糖为碳源最有利于细胞生长和银杏内酯的合成。用高效液相色谱检测结果显示, 银杏圆铃品种的悬浮培养细胞中银杏内酯B最高含量可达细胞干样质量的0.0758%。

关键词: 银杏; 细胞悬浮培养; 银杏内酯

中图分类号: S 664.3; Q 942.6 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2002) 04-0321-05

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 叶中主要有效成分黄酮苷和萜内酯具有多种药理作用。银杏叶提取物及其加工产品在上世界上每年销售额达数十亿美元^[1]。银杏叶中的银杏内酯 (ginkgolides) 和白果内酯 (bilobalide) 为银杏所特有的重要成分, 至今尚未发现存在于其它任何植物中^[2]。银杏内酯 (包括ginkgolide A、B、C、D、M和J) 被认为是当前最有应用前景的天然血小板聚集诱导因子PAF受体拮抗剂, 且尤以银杏内酯B (GB) 活力最强^[3]。由于银杏内酯在天然植物中含量极低, 且主要存在于根和处于生长状态的叶中, 采叶影响树木的生长, 材料来源困难。因此世界上许多科学家都对银杏细胞培养生产银杏内酯进行了一定的研究, 1991年加拿大的Carrier等^[4]首先确定了培养物中银杏内酯的存在, 1993年又报道银杏内酯 (GA+GB+GC) 在愈伤组织和悬浮细胞中含量分别为0.0026%和0.0047%。戴均贵等^[5]1998年报道由银杏叶诱导的愈伤组织中GB含量达0.0023%, 于荣敏等^[6]1999年报道银杏悬浮培养物中银杏内酯含量可达0.0099%。作者由高内酯含量圆铃品种银杏树幼叶诱导出愈伤组织, 经多代驯化、筛选建立了优良银杏细胞悬浮系, GB含量可达细胞干样质量的0.0758%。

1 材料与方方法

1.1 材料及培养基

银杏幼叶为同一时间采自辽宁省经济林研究所的佛手、圆铃、宇香、岭南、亚甜、马铃5号、马铃9号、金坠、大白果、梅核、圆头、七星果等12个不同品种的3~5年生幼树, 每品种选取3棵树, 采叶部位为各树南侧树冠中部最外方枝条的顶端。这些树栽于同一试验地, 其生长环境和树龄基本相同。采用由银杏幼叶诱导而来的优良绿色愈伤组织建立细胞悬浮培养系。

愈伤组织固体培养采用MS培养基附加NAA 1.0~2.0 mg/L、BA 0.5~1.0 mg/L、蔗糖30 g/L, pH 5.8, (25±1) °C, 3 000~4 000 lx强光照条件下培养, 每隔35 d继代1次。液体培养采用B₅培养

收稿日期: 2002-01-28; 修回日期: 2002-03-20

基金项目: 辽宁省教委攻关项目

银杏细胞培养物中银杏内酯的HPLC测试委托国家民委生化工程重点实验室、大连市生化工程中心、大连民族学院生化工程研究所完成, 特此致谢。

基添加 NAA 0.5~1.0 mg/L、BA 0.2~0.5 mg/L、蔗糖 30 g/L、葡萄糖 15 g/L，其它条件同固体培养，摇床转速为 110 r/min，150 mL 摇瓶中培养基装液量为 50 mL，接种量为 30~40 g/L。

1.2 细胞生长量的测定和培养物中银杏内酯的分析

悬浮培养细胞经尼龙网过滤，蒸馏水洗涤 3 次，抽滤去表面水分，称量鲜样质量 (g/L)，60℃ 烘干后称量干样质量 (g/L)。细胞增长率 = (收获细胞量 - 接种细胞量) / 接种细胞量 × 100%。

总内酯含量测定采用分光光度计法^[7]。银杏内酯的提取、纯化、检测采用 HPLC 法^[8]，仪器为岛津 LC-10A 高效液相色谱仪，色谱柱为大连依利特公司 ODS C₁₈，流动相为甲醇:水 = 33:67，进样量 10 μL，流速 1.0 mL/min；柱温 30℃，检测波长 219 nm，检测器为二极管阵列检测器。银杏内酯 B 回归方程为: $Y = 3 \times 10^{-5}X - 0.3197$, $R^2 = 0.9915$ 。(Y 为 GB 含量 μg, X 为峰面积)。银杏内酯生物产量 (mg/L) = 内酯含量 (%) × 收获细胞干样质量 (g/L) × 1 000。

2 结果与分析

2.1 不同品种幼叶愈伤组织中银杏内酯含量比较

不同品种银杏幼叶及其愈伤组织中银杏内酯含量 3 次测定结果的平均值见表 1。幼叶内酯含量以圆铃和金坠品种最高，分别达 0.43% 和 0.41%；七星果品种最低，为 0.13%；愈伤组织内酯含量以金坠品种最高，为 0.334%，有 3 个品种未检测到银杏内酯。一般规律为，银杏叶中内酯含量高的品种，由它们诱导而来的愈伤组织中的银杏内酯含量也较高。经多次继代培养和筛选，选取圆铃银杏品种幼叶诱导而来的愈伤组织来建立细胞悬浮培养系。

2.2 接种量对悬浮培养细胞生长的影响

在以生产次生代谢产物为目的的植物细胞悬浮培养中，要求细胞具有较高的生长速率，获得

表 1 不同品种银杏叶和愈伤组织中银杏内酯的含量

Table 1 Content of ginkgolides of young leaf and callus from varieties of *Ginkgo biloba* L.

品 种 Varieties	幼 叶 In young leaf (%)	愈 伤 组 织 In callus (%)
佛手 Foshou	0.16	0.000
圆铃 Yuanling	0.43	0.282
宇香 Yuxiang	0.14	0.036
岭南 Lingnan	0.37	0.251
亚甜 Yatian	0.27	0.000
马铃 5 号 Maling 5	0.26	0.156
马铃 9 号 Maling 9	0.35	0.237
金坠 Jinzhui	0.41	0.334
大白果 Dabaiguo	0.22	0.149
梅核 Meihe	0.16	0.107
七星果 Qixingguo	0.13	0.125
圆头 Yuantou	0.19	0.000

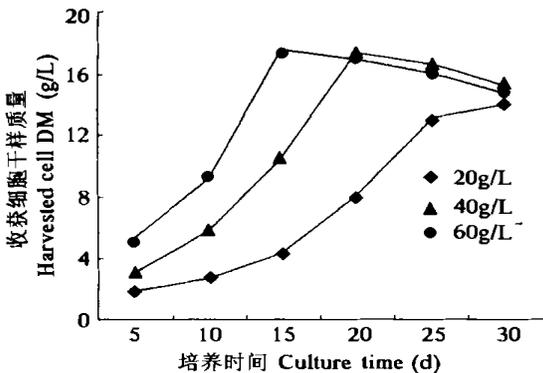


图 1 接种量对悬浮培养细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of inoculation on the growth of suspension on cell

了高生长速率的细胞系后，再通过各种影响因子的调控来提高细胞系中次生代谢产物含量。本试验研究了 20、30、40、50、60、70 g/L 接种量 (鲜样质量) 对银杏细胞生长的影响，结果见图 1 (为简化图中曲线只绘出了 20、40、60 g/L 接种量)。细胞生长达到最大量的周期与接种量直接相关，接种量大，细胞生长周期短；接种量小，细胞生长周期长。因此接种量以 30~40 g/L 为佳。

2.3 碳源对银杏悬浮培养细胞生长和银杏内酯含量的影响

本试验中观察了蔗糖、葡萄糖、麦芽糖和乳糖等不同碳源对悬浮培养细胞生长和内酯含量的影响。选用的不同碳源浓度均为 30 g/L，经 3 次重复试验，计其平均值。由表 2 可见，以蔗糖为碳源最适于银杏内酯的积累，葡萄糖为碳源则最适于细胞的生长，其它两种碳源效果较差。对不同浓度的蔗糖和葡萄糖组合进一步的研究结果见图 2。在蔗糖浓度较低范围内，细胞增长倍数及内酯的含量都随蔗糖浓度的增加而增加，蔗糖浓度为 45 g/L 时银杏内酯含量最高。但在培养过程中发现若单纯以蔗

糖为碳源, 培养细胞随继代次数的增加易发生褐化现象。当培养液中的碳源采用蔗糖和葡萄糖混合供给的方式时则不易发生褐化现象, 而且银杏内酯的生物产量与单独使用蔗糖差别不大, 因此本试验选择每升培养基中附加 30 g 蔗糖和 15 g 葡萄糖作为银杏悬浮培养细胞系的碳源。

表 2 不同碳源对悬浮培养细胞生长和内酯含量的影响

Table 2 Effect of different carbon sources on the growth of suspension cell and the content of ginkgolides

碳源 Carbon source	接种量 Inoculation density (g/L)	细胞收获量 Harvest cell (DM g/L)	银杏内酯 Ginkgolides	
			含量 Content (%)	产量 Output (ng/L)
蔗糖 Sucrose	40	11.2	0.304	3.40
葡萄糖 Glucose	40	12.7	0.220	2.78
麦芽糖 Maltose	40	8.4	0.118	0.99
乳糖 Lactose	40	9.5	0.101	0.96

2.4 光照强度和光质对悬浮培养细胞生长和银杏内酯含量的影响

在其它条件相同情况下将培养物置于不同光强下培养, 由图 3 可见, 在 0~2 000 lx 范围内培养细胞增长随光强的增加而增加, 此后细胞增长有下降趋势, 但银杏内酯的含量却一直随光强的增加而增加。而且在培养的过程中, 悬浮细胞会出现浅绿、深绿、黄绿等不同的颜色, 随着光照强度的增加, 培养细胞有逐渐增绿的趋势。内酯含量测定表明培养细胞越绿, 内酯含量也越高。从悬浮细胞的生长及内酯含量等诸多因素考虑, 以 3 000 lx 的较强光照较为适宜。

此外, 试验中还分别在日光灯管外加罩白色、红色和蓝色透明塑料薄膜, 在光强都为 2 000 lx 条件下对悬浮培养细胞在白光、红光和蓝光等不同光质下的生长速度和内酯含量进行了对比。研究表明, 红光最有利于细胞的生长, 增长倍数可达 7.3 倍, 但细胞中内酯含量最低, 为 0.201%; 蓝光下细胞生长最慢, 增长倍数为 6.1 倍, 但内酯含量最高, 为 0.352%; 白光下细胞的生长倍数和内酯含量居中, 分别为 6.8 和 0.303% 左右。由此可见同类细胞在不同的光质下反应是不同的。

2.5 银杏悬浮培养细胞生长曲线和银杏内酯形成的关系

在培养条件相同情况下, 分别于培养后的第 3~24 天中每 3 d 随机抽取 6 瓶培养物, 测定培养细胞的生长量和其中内酯含量, 结果见图 4。银杏悬浮培养细胞生长曲线基本为 S 型, 其中 0~3 d 为延滞期, 3~18 d 为指数生长期, 18~21 d 为静止期, 21~24 d 为衰亡期。

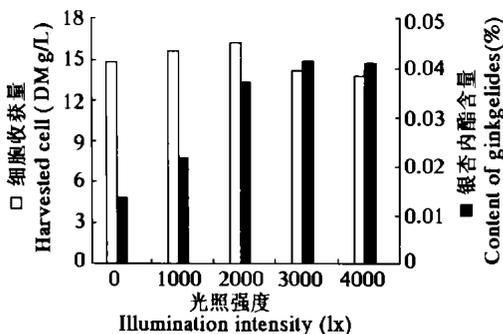


图 3 光照强度对细胞生长和银杏内酯含量的影响

Fig. 3 Effect of illumination intensity on the growth of cell and the content of ginkgolides

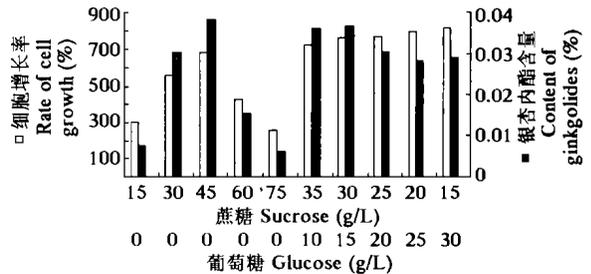


图 2 碳源浓度对悬浮培养细胞生长和银杏内酯含量的影响

Fig. 2 Effect of concentration of carbon source on the growth of suspension cell and content of ginkgolides

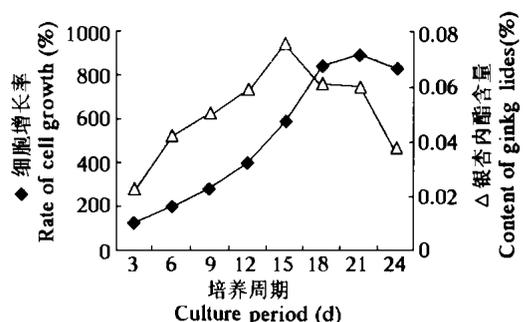


图 4 银杏悬浮培养细胞生长曲线和内酯含量变化曲线

Fig. 4 Growth curve of suspension cell of *Ginkgo biloba* L. and ginkgolides content curve

在培养前期银杏内酯含量基本随细胞增长而逐渐增加, 第 15 天时达到最大值, 此后含量开始下降。进入细胞衰亡期后银杏内酯含量下降了 48%。考虑到银杏细胞增长指数和银杏内酯含量两个因

素, 以选取生长到第 20 天时收获细胞为宜。

2.6 银杏悬浮培养细胞中银杏内酯含量的分析

采用 HPLC 法对细胞培养物进行检测, 并多次重复, 结果稳定。从高效液相色谱图 5 可见, 银杏细胞悬浮培养物中含有 GA 和 GB 两种成份, 而且 GB 的含量较高, 可达到细胞干样质量的 0.0758%。

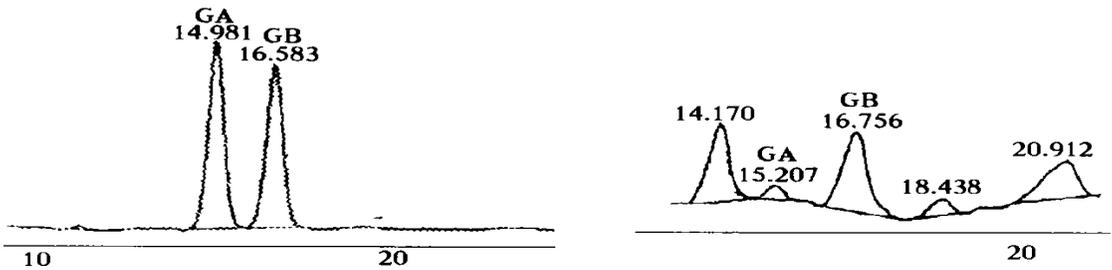


图 5 银杏内酯 A (GA) 和银杏内酯 B (GB) 标准品 (左) 与银杏细胞培养物中银杏内酯 (右) HPLC 图

Fig. 5 HPLC profile of standards of ginkgolide A and ginkgolide B (left) and HPLC profile of ginkgolides of cell extract of *Ginkgo biloba* L. (right)

3 讨论

3.1 银杏品种与细胞培养物中内酯含量的关系

外植体来源是影响植物细胞培养物次生代谢产物产生和积累的重要因素之一。一般认为若用次生代谢产物含量高的植物或器官为外植体诱导出来的愈伤组织进行细胞悬浮培养, 其培养物中次生物质的含量也高。Kimesley 等^[9]用烟草试验证明, 来自高尼古丁含量的烟草愈伤组织中其尼古丁含量也高。类似的结果也存在于长春花组织培养中^[10]。

本研究分析了 12 个银杏品种叶片中内酯含量, 观察到它们的内酯含量差别较大, 最大相差达 3.3 倍, 而且由其分别诱导的愈伤组织中内酯含量也不相同, 并基本与原植物成正相关性, 这与前人对其它植物的研究结果相一致。细胞培养过程中的影响因素是在此基础上的人工调控, 其增效作用在每一品种是类似的, 且高内酯含量的细胞培养物增幅更大。因此是基因型起决定性作用。前人在进行银杏细胞悬浮培养的工作中, 未重视寻找高内酯含量的银杏品种, 这可能是银杏细胞培养技术难以转化生产的重要原因之一。我国拥有的银杏品种达 100 多种, 选取高内酯含量的银杏品种进行细胞培养将会取得事半功倍的结果。本试验选取银杏内酯含量高的圆铃银杏树幼叶进行愈伤组织的诱导, 建立高产细胞悬浮系, 从而获得了 GB 的较高含量, 为其产业化生产打下了基础。

3.2 细胞分裂和分化与银杏细胞培养物中银杏内酯含量的关系

我们的试验结果表明, 生长快、分裂旺盛的细胞中银杏内酯含量低, 当细胞进入对数分裂后期, 细胞开始分化时银杏内酯含量高。光照试验的结果表明, 暗培养条件下的白色细胞中银杏内酯含量低, 光照较强的绿色细胞中银杏内酯含量高。许多植物次生代谢产物的合成与叶绿体的分化有关。齐藤和季^[11]比较了 *Thermopsis lupinoides* 的白色愈伤组织和绿色愈伤组织合成扇豆生物碱的差异, 结果表明, 白色愈伤组织没有生物碱的积累, 而绿色愈伤组织中含有生物碱, 其含量与组织或器官中叶绿素的含量成正比。在 Chamomile 的培养物中, 只有光下生长的绿色细胞才能积累与原植物同样的精油成分^[12]。一般认为次生代谢产物的积累与细胞分化程度之间存在着正向相关性, 即细胞分化程度越高次生代谢产物含量越高。从上述这些生物碱的生化合成途径分析与叶绿素含量的提高无直接联系, 但叶绿素的产生, 叶绿体的形成表示着细胞分化程度的提高, 任何一种生物碱类物质都是储存在细胞的液泡中, 分化程度高, 积累多。依据前人和我们的试验结果, 认为寻找细胞分裂与分化的平衡点是植物组织细胞培养生产次生代谢产物的关键, 应从细胞的生长周期、目标产物的含量及其收获总量来综合考虑确定细胞的最佳收获时期。

参考文献:

- 1 苍宁. 银杏叶制品的研究、开发及市场. 中国医药情报, 1995, 1 (4): 21~ 22
- 2 Bruno C, Cuppin R. Regeneration of motor nerves in bilobalide treated rats. Plant Medical, 1993, 59: 302~ 307
- 3 方小江, 沈琴, 戴瑞鸿. 银杏叶提取物对心血管的作用. 中成药, 1998, 20 (10): 43~ 44
- 4 Carrier D, Chauret N, Mancini. Detection of ginkgolide in *Ginkgo biloba* cell culture. Plant cell report, 1991, 10: 256~ 259
- 5 戴均贵, 朱蔚华, 吴蕴祺. 不同培养、激素、碳源和氮源对银杏愈伤组织生长及银杏内酯 B 形成的影响. 中草药, 1998, 29 (增刊): 63~ 66
- 6 于荣敏. 银杏愈伤组织培养及其代谢产物银杏内酯的研究. 生物工程学报, 1999, 15 (1): 52~ 58
- 7 陈维军, 谢笔钧, 胡慰望. 分光光度计法快速测定银杏叶中总萜内酯的研究. 中草药, 1998, 29 (增刊): 45~ 46
- 8 姚渭溪. 银杏内酯的快速测定方法研究. 药物分析杂志, 1999, (1): 38~ 41
- 9 Kinesley A. The content of nicotine in tobacco. W. Alton Jones Cell Science Centre Annual Report, 1981, 2: 48~ 52
- 10 Zenk M H. Plant tissue culture and its biotechnological application. New York: Springer Verlag, 1977. 27~ 43
- 11 齐藤和季. 第十一回植物组织培养学大会シンポジウム講演要旨集. 岡山: 岡山大学出版社, 1989. 60~ 65
- 12 Holden M A. Manipulating secondary metabolism in culture. In: Robins J, Rhodes M. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1988. 57~ 65

Studies on Increasing Ginkgolides Synthesized in Suspension Cell Culture of *Ginkgo biloba* L.

Wang Guanlin¹, Li Chunbin², and Fang Hongjun¹

(¹Life Science College of Liaoning Normal University, Dalian 116029, China; ²Chemical Engineering College of Dalian University of Technology, Dalian 116012, China)

Abstract: After determination of the content of ginkgolides from varieties of *Ginkgo biloba* L., it was shown that there were significantly different contents of ginkgolides from different genotypes of *Ginkgo biloba* L., in which the highest were in Yuanling and Jinzhui, the contents reached 0.43% and 0.41% respectively, the lowest was in Qixingguo, the content was 0.13%, the highest content of ginkgolides in calli from varieties of *Ginkgo biloba* L. was in Jinzhui and reached 0.334%. There were calli from 3 varieties producing no ginkgolide. The callus with high content of ginkgolides and growing well was cultured on B₅ media. The effects of different growth factors on growth of cell and content of ginkgolides were studied. The result showed that 50 mL culture solution in the 150 mL flask, the inoculation 30–40 g/L, the initial pH in culture solution 5.8, 3 000–4 000 lx lumination in the intensity and the mixture of 30 g/L sucrose and 15 g/L glucose were optimum to synthesis of ginkgolides and growth of cell. The result by HPLC detection showed ginkgolides in suspension cells reached 0.0785% of dry mass of cells from the variety Yuanling.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; Cell suspension culture; Ginkgolides

《果品品质研究》

新书推荐

关军锋 主编 河北科学技术出版社, 石家庄, 2001

《果品品质研究》是根据我国果品生产发展方向和在果品品质研究日益受到重视的前提下编写的。全书共分五篇, 第一篇系统介绍果品品质的概念、风味物质及绿色果品的生产; 第二篇着重阐述采前果实品质的发育机理及影响因素, 如生态、水分、激素的调控及果实品质的遗传和改良; 第三篇总结了减少采后果实品质损失的策略及途径, 介绍了重要氧化酶的理化性质; 第四篇分析了主要果实生理病害的发生机理和控制途径; 第五篇介绍了果实品质的数学评价方法和常见果品品质的测定技术。